

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin
Klinikum Steglitz

Direktor: Prof. Dr. med. Rolf Schröder

**Nachweis von zirkulierenden
Insulin-Antikörpern beim Diabetiker
mit dem Zytopherometer**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Tiedemann, Harald

Berlin

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin
Klinikum Steglitz

Direktor: Prof. Dr. med. Rolf Schröder

**Nachweis von zirkulierenden
Insulin-Antikörpern beim Diabetiker
mit dem Zytopherometer**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin**



**vorgelegt von
Tiedemann, Harald
Berlin**

Referent: Professor Dr. med. H. M i c h e l

Korreferent: Professor Dr. med. G. I a u d a h n

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 15. Oktober 1973



Inhaltsverzeichnis

I. Klinik und Pathophysiologie der zirkulierenden Insulin-Antikörper	1
II. Prinzip der Zellelektrophorese	7
III. Das Zytopherometer	8
1. Die Meßkammer	9
2. Die Herstellung der Elektroden	11
3. Die Kühlvorrichtung	15
4. Das optische System und die elektrischen Einrichtungen	16
5. Füllung der Meßkammer - die Meßflüssigkeit	18
6. Fehlerquellen	20
IV. Die elektrophoretische Beweglichkeit und ihre Berechnung	22
V. Eigene Versuche	24
1. Durchführung	24
2. Technik	25
VI. Kasuistik	27
VII. Ergebnisse	28
VIII. Diskussion	39
IX. Zusammenfassung	43
X. Literaturverzeichnis	44

I. Klinik und Pathophysiologie der zirkulierenden Insulin-Antikörper

Bei nahezu allen insulinbehandelten Diabetikern lassen sich nach genügend langer Behandlungsdauer zirkulierende insulinbindende Antikörper nachweisen. Nach einer Insulinbehandlung von drei Monaten ist in den meisten Fällen die Menge dieser Antikörper relativ klein, und der Insulinbedarf wird dadurch kaum beeinflusst. Die Bindung exogenen Insulins an die Antikörper führt normalerweise zu einer mäßigen Steigerung des täglichen Insulinbedarfs, über die vom Menschen effektiv benötigte Menge von ca. 30 E, was klinisch von untergeordneter Bedeutung ist (Kerp).

Die antigenen Eigenschaften des Insulins wurden als schwach eingeschätzt oder auch negiert, da es ein körpereigenes Hormon ist und nur ein Molekulargewicht von 6000 hat (Scheiffarth). Es muß aber angenommen werden, daß Insulin durch seinen relativ hohen Gehalt an aromatischen Aminosäuren ein wirksames Polypeptidantigen ist. (Mitzkat; Kerp und Mitarbeiter). Noch wesentlicher erscheint die Tatsache, daß das Hormon unter den in den meisten Handelspräparaten vorliegenden Lösungsbedingungen ein durch Assoziation vergrößertes Molekül mit einem Molekulargewicht zwischen 12 000 und 36 000 hat. Auch für Insulin gilt, wie für alle Eiweißkörper, daß Kristallisation noch kein Kriterium für absolute Reinheit des Präparates darstellt. Solche Beimengungen an Begleiteiweißen, es handelt sich bei den konventionellen Insulinpräparaten ebenfalls um Insuline (z.B. Monodesamido-Insulin, Arginin-Insulin, Insulin-Äthylester), können die Sensibilisierung gegenüber dem Insulineiweiß selbst beeinflussen, und zwar in ähnlicher Weise, wie die Antigeneigenschaften vieler Eiweißkörper durch Beigabe von bestimmten anderen Substanzen gesteigert werden können. Diese sogenannten Verunreinigungen spielen also offenbar eine wesentliche Rolle für die Sensibilisierung durch ein bestimmtes Insulinpräparat (Stavitsky und Arquilla; Michel).

Diese Adjuvanswirkung zeigt sich in einer Vermehrung

der zirkulierenden Antikörper. So zeigte sich bei einer Gruppe von Kaninchen, die mit einem Insulin-Adjuvanskomplex behandelt wurde, daß die Hälfte der Tiere relativ insulinresistent wurde, wohl als Folge einer Bindung neutralisierender Antikörper gegen das Insulineiweiß (Rausch-Stroomann und Sauer). Neuere Untersuchungen ergaben, daß diese Begleiteiweiße nicht nur adjuvansartig, sondern selbst als Antigene wirken (Schlichtkrull und Mitarbeiter).

Im allgemeinen sind die antigenen Eigenschaften einer Verbindung umso stärker, je größer das Molekül und je größer die Speziesdifferenz ist. Diese Eigenschaften, ebenso wie die Eiweißnatur der Verbindung, stellen aber hinsichtlich ihrer Antigenität keine *conditio sine qua non* dar, denn auch sehr kleinemolekulare Substanzen sowie Stoffe ohne Eiweißcharakter und auch solche endogenen Ursprungs können die Bildung von Antikörpern auslösen. (Grabar). Die Spezifität des Antigens wird dabei allein von der räumlichen Anordnung gewisser chemischer Gruppen im Molekül bestimmt, sodaß bei gleicher chemischer Zusammensetzung eines Stoffes eine Änderung seiner räumlichen Struktur mit Verlagerung antigenen Motive eine Veränderung der antigenen Eigenschaften auslöst. Im umgekehrten Sinne kann eine Substanz mit identischen antigenen Motiven auch mit einem Antikörper reagieren, der von einem anderen Antigen geprägt wurde, das chemisch anders zusammengesetzt ist (Kerp, Kieling und Kasemir). Die Reaktion kann aber nur dann eintreten, wenn die räumliche Anordnung der determinanten antigenen Gruppen bei beiden Antigenmolekülen weitgehend übereinstimmt. Für die Kreuzreaktion eines Insulinantikörpers mit speziesdifferenten Insulinen von unterschiedlichem Aminosäureaufbau ist diese Tatsache von Wichtigkeit. Das gilt auch für die Sensibilisierung eines Organismus mit seinem eigenen homologen Insulin (Ditschuneit und Federlin). Die heute zur Verfügung stehenden Insuline werden von Rind und Schwein gewonnen. Rinder- und Schweineinsulin unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer

Wirkung, weisen aber im Vergleich zum menschlichen Insulin geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf. Zwar besteht der Unterschied zum Schweine-Insulin nur in einer einzigen endständigen Aminosäure des aus 51 Aminosäuren zusammengesetzten Moleküls (Meyer), er kann aber bereits zur Entwicklung antigener Eigenschaften selbst des Schweine-Insulins genügen. Rinder-Insulin weicht in drei Positionen vom menschlichen Insulin ab. Einige Autoren fanden, daß nach Applikation von Rinder-Schweine-Mischinsulin neutralisierende Antikörper auftreten, die Rinder- und Schaf-Insulin stärker binden können als Schweine- und Pferde-Insulin (Berson und Yalow). Hieraus geht hervor, daß zirkulierende Insulin-Antikörper keine ausgeprägte Spezifität zeigen.

Vergleichende Untersuchungen zur Frage der Antigenität von Rinder- und Schweine-Insulin haben gezeigt, daß die Konzentration zirkulierender Insulin-Antikörper, ausgedrückt durch die maximale Insulinbindungskapazität, von Probanden mit einem Insulintagesbedarf von maximal 64 E in drei Viertel der Fallzahl eine größenordnungsmäßig gleiche Bindung beider Insuline ergab, in einem Viertel der Patientenzahl überwog die Bindung an Rinder-Insulin, während Schweine-Insulin nur vereinzelt stärker gebunden wurde (Meyer). Das Auftreten von Antikörpern gegen Rinder-Insulin konnte mit der Zellulose-Bindungsmethode gezeigt werden (Kerp, Steinhilber und Kasemir; Fankhauser und Goetz). Mit derselben Methode ist der gesamte Verlauf der Antikörper-Bildung gegen Rinder-Insulin, bei subcutanen und intravenösen Gaben, vom Beginn der Insulinbedürftigkeit an, gezeigt worden (Petrides). Andere Autoren führten Untersuchungen über das Verhalten der Insulin-Antikörper nur unter intravenöser Insulintherapie durch. Dabei stellten sich bei den behandelten Patienten deutlich erhöhte Aktivitäten der Insulin-Antikörper dar (Bemm und Mitarbeiter).

In den oben erwähnten Verlaufsuntersuchungen wurde mit der Dauer der Insulinbehandlung eine Bindung des markierten Insulins in der γ -Globulin Bande sichtbar. Histoimmunologische Tests haben ergeben, daß Insulin-Antikörper zur Gruppe der γ -Globuline gehören (Mancini und Mitarbeiter). In neueren Untersuchungen über die Wirkung der Insulin-Antikörper konnte festgestellt werden, daß das injizierte Insulin mit dem Antikörper einen reversiblen löslichen Komplex bildet, der weiterhin in der Blutbahn zirkuliert (Shipp und Mitarbeiter; Berson und Yalow). Somit sind diese Antigen-Antikörper Reaktionen als reversible bimolekulare Reaktionen aufzufassen. Nach den Gesetzen der Massenwirkung stellt sich deshalb zwischen der Konzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes und dem Produkt aus der Konzentration von freiem Antikörper und freiem Antigen immer ein bestimmtes Gleichgewichtsverhältnis ein. Das Molekulargewicht der Komplexe ist hoch und wird in Grenzen zwischen 150 000 und 630 000 angegeben, wobei sie auch als Aggregate vorliegen können (Ditschuneit und Federlin). Beim immunisierten Tier sind die Insulin-Antigen-Antikörper-Komplexe in der Elektrophorese durch einen Gipfel im β - γ -Globulinbereich gekennzeichnet (Bemm).

Die Analyse der Insulinbindung für die untersuchten Anti-insulinseren ergab, daß jedes Serum nebeneinander zwei Hauptkomponenten an Antikörperbindungsstellen für Insulin enthält, die sich hinsichtlich der Festigkeit der mit Insulin gebildeten Komplexe stark voneinander unterscheiden. (Ditschuneit und Federlin; Kerp und Mitarbeiter). Aus den Untersuchungen von Berson und Yalow ergab sich, daß der Befund zweier Typen an Bindungsstellen für Insulin tatsächlich auf unterschiedlichen Bindungsstellen der Antikörper und nicht auf einer Multivalenz des Insulins gegenüber einheitlichen Antikörpern beruht.

Anschließend soll noch ein serologischer Nachweis von zirkulierenden Insulin-Antikörpern erwähnt werden, den wir als Kontrollversuch neben dem Nachweis von Insulin-Antikörpern mit dem Hämozytopherometer durchführten. Es handelt sich um die passive oder indirekte Hämagglutinationsreaktion nach Boyden. Sie beruht auf der Tatsache, daß Proteinmoleküle an die Oberfläche vorbehandelter Erythrocyten adsorbiert und die auf solche Weise proteinkonjugierten roten Blutkörperchen durch spezifische Antikörper eines homologen Antiserums zur Zusammenballung gebracht werden. Über die Verwendbarkeit der passiven Hämagglutinationsreaktion nach Boyden sind Untersuchungen von Schiffarth und Frenger durchgeführt worden.

Unter Berücksichtigung der passiven Hämagglutination haben Steigerwald und Spielmann eine Methode zum Nachweis von Insulin-Antikörpern beschrieben, die ihrem Wesen nach einer Kombination eines Hämagglutinationstestes und eines speziellen Coombstestes entspricht.

Ähnlich der Boyden'schen Technik sind Antikörper gegen Insulin im Serum insulinresistenter Diabetiker und künstlich immunisierter Versuchstiere mit Hilfe der Hämagglutinations-Hämolyse-Technik durchgeführt worden (Arquilla und Stavitsky). Diese Methode beruht auf der Röhrenagglutination der Bis-Diazo-Benzidin behandelten Hammel- oder Kanichenerythrocyten.

Von diesem Verfahren abweichend, haben Szécsey und Mitarbeiter die roten Blutkörperchen mit Tanninsäure behandelt. Zur Reaktion wurden Hammel- und humane Erythrocyten verwendet.

Mit der folgenden Arbeit wurde versucht, zirkulierende Insulin-Antikörper durch vergleichende Bestimmungen der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten von tanninvorbehandelten humanen Erythrocyten, an deren Oberfläche als Antigene Schweine- bzw. Rinder-Insulin adsorbiert wurden, die mit

Insulin-Antikörpern konjugiert waren, mit dem Hämozytopherometer nachzuweisen.

II. Prinzip der Zellelektrophorese

Blutzellen und auch andere mikroskopisch kleine, suspendierbare biologische Objekte - Bakterien, Viren, Spermien usw. - zeigen nach Aufschwemmung in einem wässrigen Medium ein elektrisches Potential. In einem elektrischen Feld werden diese Ladungsträger dementsprechend in bestimmter Richtung auf einen der beiden elektrischen Pole mit einer für sie charakteristischen Geschwindigkeit bewegt. Ist der Ladungsträger ein festes Teilchen, so wird dieser Vorgang als Kataphorese oder Elektrophorese bezeichnet, ist er eine flüssige Substanz, so spricht man von Elektroosmose. Die Zellelektrophorese ermöglicht, die Wanderung mikroskopisch zu beobachten und zu messen. Unter bekannten bzw. konstanten Messbedingungen lassen sich reproduzierbare und vergleichbare Wanderungsgeschwindigkeiten ermitteln. Durch zellelektrophoretische Untersuchungen können nur Rückschlüsse auf das elektrokinetisch wirksame Potential der gesamten Zelloberfläche, nicht aber auf die chemischen Strukturen, welche dieses Potential verursachen, gezogen werden.

Jede Zelle hat eine physikalisch-chemisch charakterisierte Oberfläche, die sich in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ausdrückt. Vorgänge an Zelloberflächen lassen sich zellelektrophoretisch nur dann erfassen, wenn damit eine nennenswerte Potentialveränderung verbunden ist. Durch Verschiebung des Gleichgewichts von positiven und negativen strukturelbundenen Ladungsträgern können solche Potentialunterschiede verursacht sein (Ruhensroth-Bauer und Sachtleben).

III. Das Zytopherometer

Das Zytopherometer dient zur Bestimmung der elektrischen Oberflächenladung suspendierter mikroskopischer Teilchen aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Die zu dieser Bestimmung benutzte Suspension befindet sich in der Meßkammer eines sogenannten Elektrophorese-Systems. Da die Meßkammer während der Beobachtung des Verhaltens der Teilchen zur Ausschaltung von Einflüssen, welche die Messung der Wanderungsgeschwindigkeit verfälschen können, senkrecht stehen muß, wurde die optische Achse des Mikroskops horizontal angeordnet. Es wird von einer stabilen, auf einer schweren Grundplatte befestigten Mikroskopsäule getragen. Als Beobachtungsobjekt dient ein Spezialobjektiv. Mit ihm können die Objekte entweder nach dem Hellfeld- oder dem Phasenkontrast-Verfahren abgebildet werden. Zur Einstellung des Bildes ist ein Grob- und ein Feintrieb vorhanden. Eine zweite Säule trägt das Elektrophorese-System mit seinen Zu- und Ableitungen sowie die mikroskopische Beleuchtungsanordnung. Diese besteht aus einem in der Säule eingebauten, fest justierten Hellfeld-Phasenkontrast-Kondensor und der Lichtquelle.

Das Elektrophorese-System ist zwischen Mikroskoptubus und Säule auf einer dreh- und zentrierbaren Tischplatte abnehmbar befestigt. Die Meßkammer steht beiderseits über T-Stücke mit je einer unpolarisierbaren Elektrode in Verbindung. Durch zwei über die T-Stücke angeschlossenen Schläuche erfolgt die Füllung oder Entleerung der Meßkammer sowie deren Reinigung. Hierzu ist die Drehbarkeit der Tischplatte notwendig. An den Abflußschlauch wird zur Erleichterung der Entleerung zweckmäßigerweise eine durch Wasserpumpe betriebene Saugflasche angeschlossen.

1. Die Meßkammer

Die Messung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit erfolgt durch mikroskopische Beobachtung einzelner Zellen. Hierzu werden Zellaufschwemmungen in eine entsprechende Meßkammer gebracht. Die Kammer hat eine rechteckige Form und ist horizontal - vertikal auf einer Plexiglasplatte befestigt. Manche Autoren bevorzugen röhrenförmige Meßküvetten (Seaman und Heard).

Um hydrostatische Druckunterschiede der zwei Seiten zu vermeiden, ist die Kammer streng symmetrisch gebaut. Ihre Ausmessungen betragen etwa 40 mm : 14 mm : 0,7 mm. Die Kammerwände müssen durchsichtig sein.

Flüssigkeit läßt sich an der Kontaktfläche mit Glas oder ähnlichem Material positiv auf, wobei die Gefäßwand negativ aufgeladen ist. Infolge Anlegens eines elektrischen Feldes an die Kammer strömt die Flüssigkeit entlang der Kammerwand zum negativen Pol. Da sich die dort angelangte kathodenwärts strömende Flüssigkeit stauen würde, kommt es zum Strom in der Mitte der Kammer wieder in umgekehrter Richtung. Trägt man die Wanderungsgeschwindigkeit auf die Ordinate und die entsprechende Tiefe der Meßkammer auf die Abszisse eines Koordinatensystems auf, so ergibt sich eine Parabel (Lukiewicz und Korohada). Zwischen beiden Strömungen liegen zwei Zonen parallel der Breitseiten der Kammer, in denen keine Strömung zu beobachten ist. Sie werden als stationäre Ebenen bezeichnet. Hier findet weder ein Hin- noch ein Rückstrom der Flüssigkeit statt. Zellen und Partikel, die sich in diesen stationären Ebenen befinden, zeigen keine Beeinflussung des vorhandenen elektrokinetischen Potentials und geben die reine elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit wieder. Die stationären Ebenen werden bestimmt, indem vorerst die

Kühlkammer mit Flüssigkeit gefüllt wird; mit Hilfe der Mikrometerschraube wird die innere Seite der vorderen Wand der Meßkammer scharf eingestellt, die Trommel auf 0 gedreht und dann so lange bewegt, bis die hintere Wand scharf eingestellt ist. Dieser Vorgang geschieht einmal mit einer luftgefüllten Meßkammer und einmal nach Füllung mit physiologischer NaCl-Lösung. Aus den so erhaltenen Werten der Tubusverschiebung wird aus Abbildung 1 die mechanische Kammertiefe in Millimetern abgelesen. Daraus erfolgt dann die Errechnung der stationären Ebenen nach den Formeln:

Vordere stationäre Ebene = $a_1 \times$ mechanische Tiefe der mit NaCl gefüllten Kammer in mm

Hintere stationäre Ebene = $a_2 \times$ mechanische Tiefe der mit NaCl gefüllten Kammer in mm

$$a_{1,2} = 0,5 \pm \frac{1}{12} \pm \frac{32}{k \times \pi^5}$$

$$k = \frac{\text{Höhe der Kammer in mm}}{\text{Tiefe der luftgefüllten Kammer in mm}}$$

2. Die Herstellung der Elektroden (Abb. 2)

Das Elektrodensystem besteht aus dem Elektrodengefäß, dem Zwischenstück und dem Zweiwegkupplungsstück. Parallele Schliffe an den einander jeweils zugekehrten Seiten der drei Elektrodenteile sowie zwei Federn ermöglichen beim zusammengefügt System eine dichte Verbindung. Die Elektroden müssen ein geschlossenes System bilden; mit offenen Systemen können Störströmungen in der Meßkammer kaum vermieden werden. Die Elektroden sollen außerdem unpolarisierbar sein. In das gläserne Elektrodengefäß tauchen am kammerfernen Teil der Elektroden Kupferstäbe in eine gesättigte Kupfersulfatlösung. Zum Abschluß nach außen dient ein Gummistopfen. Damit keine Verunreinigungen der Meßlösung mit Kupfersulfatlösung entsteht, muß das Elektrodengefäß gegen die Meßkammer durch festes Material abgeschlossen werden. Man verwendete hierzu zunächst lediglich Gipsplomben, die den elektrischen Strom leiten, wenn sie mit einer Flüssigkeit durchtränkt sind. (Ponder). Später wurde eine zweite Trennschicht mit einer Agarplombe zwischen der Meßlösung und dem Gips eingeschaltet, da sich herausstellte, daß der Abschluß allein durch die Gipsplombe nicht ausreichend war (Ruhenstroth-Bauer und Piper; Angers und Rottino). Mit diesem System sind viele Meßreihen durchgeführt und reproduzierbare Ergebnisse gewonnen worden (Ruhenstroth-Bauer und Sachtleben). Hierzu wurden ein Phosphatpuffer oder Veronalpuffer verwendet, die mit 5,4 %iger Glukoselösung verdünnt waren. Fanden die Messungen aber in Plasmen oder reinen Salzlösungen statt, so wurde beobachtet, daß eine Verzögerung der Wanderung der Zellen oder Partikel eintrat. Die Erscheinung wurde von Flüssigkeitsbewegungen, die durch die Agarvorlagen verursacht waren, ausgelöst, denn beim Stromfluß waren diese durch das sich ausbildende elek-

trische Feld in Bewegung geraten. Somit kam es zu Strömungen der Meßflüssigkeit, die der Wanderungsrichtung der negativ geladenen Zellen entgegengerichtet waren. Die Agarvorlagen füllten das Verbindungsrohr zwischen dem Kupfersulfatgefäß und dem Mittelteil vollkommen aus, sie wirkten also wie Pumpenkolben. Es erfolgte ihre Verschiebung in Richtung zur Kathode. Da die in der Meßkammer auftretende Strömung auf diese Weise kathodenwärts gerichtet war, kam es zu einer entgegengesetzten Wanderung der Zellen. Wurde nun die Stromstärke erhöht, erfolgte eine beschleunigte Wanderung des Agars bei scheinbarer Verminderung der Beweglichkeit der Zellen (Sachtleben und Mitarbeiter).

Gelatine, die bei der Messung sehr fest an der Glaswand haftet, kann keine der genannten Strömungen hervorrufen. Andere Materialien wie Silicatgele, Stäbkeegel oder Polyurethanschaumstoff geringer Porengröße haben sich dagegen weniger bewährt (Sachtleben und Mitarbeiter). Allerdings zeigte sich, daß Glaspartikel eine Verringerung der Beweglichkeit der Erythrocyten durch Adsorption von Gelatinemolekeln erleiden, die in die Meßlösung geraten. Auch an Zellen könnte bei Verwendung von Puffern mit geringer Ionenstärke eine Gelatineadsorption auftreten. Diese Diffusion der Gelatinemolekel in die Meßlösung läßt sich dadurch vermeiden, indem man das Ende der Elektrode, in deren Öffnung die Gelatine frei liegt, in Formaldehydlösung eintaucht. Hierdurch wird eine Vernetzung der Gelatinemolekel über Methylenbrücken erreicht. Anschließend muß zur Entfernung überschüssigen Formalins gründlich in Pufferlösung gewässert werden. Auch durch mehrmaliges Eintauchen in Kollodiumlösungen, wodurch eine Art Dialysiermembran über die Gelatine gelegt wird, oder durch entsprechende handelsübliche semipermeable Membranen kann ein wirksamer Abschluß erreicht werden.

In das Elektrodengefäß wird eine Gelatineplombe, eine Gipsplombe und CuSO_4 -Lösung, in die die Kupferelektrode eintaucht, gebracht. Die Gipsplombe wird folgendermaßen angelegt: Ein zusammengerollter Papierstreifen wird von dem engeren Ende des Gefäßes aus soweit eingeführt, daß er den seitlichen Ansatzstutzen gerade überragt. Dann wird etwa zwei Zentimeter hoch trockenes Gipspulver von dem weiteren Elektrodengefäßende aus eingefüllt, physiologische NaCl -Lösung auf die Gipssäule getropft, bis sie gerade ganz durchfeuchtet ist, und durch leichtes Klopfen ein eventuell entstandener Hohlraum beseitigt. Nach einigen Stunden ist die Gipsplombe hart, sie soll aber erst vierundzwanzig Stunden später weiterverwendet werden. Nach drei bis vier Wochen muß die Gipsplombe erneuert werden. Dazu muß zunächst die alte mit einem spitz ausgezogenen Spatel entfernt und das Gefäß gründlich gereinigt werden.

Zum Herstellen der Gelatineplombe wird die Gelatine wie folgt angesetzt: 10 ml physiologischer NaCl -Lösung, die mit einem Phosphatpuffer auf pH 7,3 gebracht worden ist, wird in einem weithalsigen Erlenmeyerkolben mit etwa 6 g Gelatina alba überschichtet. Unter leichtem Schütteln sinken die Gelatinekörnchen ab. Danach wird die Aufschwemmung 60 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wird sie in ein heißes Wasserbad gestellt. Nach 30 Minuten ist eine homogene Gelatinelösung entstanden. Diese Lösung kommt in heißem Zustand in den unteren engeren Teil des Elektrodengefäßes unter Vermeidung von Luftblasenbildung, bis zunächst der seitliche Ansatzstutzen gefüllt ist. Dieser wird dann mit einem kleinen Gummistopfen verschlossen. Dann wird das Gefäß so gefüllt, daß noch eine überstehende Kuppe aus Gelatine gebildet wird. Das Elektrodengefäß muß danach ca. 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur senkrecht stehen, bis die Gelatine erstarrt ist. Danach kann die überstehende Gela-

tinekuppe mit einer wassergefeuchteten Rasierklinge scharf abgeschnitten werden. Der weite Teil des Elektrodengefäßes wird mit einer gesättigten CuSO_4 -Lösung gefüllt und der Gummistopfen mit der hindurchgeführten Kupferstabelektrode aufgesetzt. Jetzt wird der Membranfilter (Ultracellfilter, Durchlaufstufe feinst) auf das enge Ende des Elektrodengefäßes gelegt und das Zwischenstück so daraufgesetzt, daß dessen Glasfrittenabschluß nach außen zeigt. Auf dieses Ende wird wiederum eine der oben genannten Membranen gelegt. Zuletzt werden die drei Teile mittels zweier Federn fest verbunden.

Mit einem kurzen Stück Silikonkautschukschlauch wird eine möglichst enge Verbindung zwischen den Meßkammerenden und den inneren Enden der Zweiwegkupplungsstücke der Elektroden hergestellt. Das äußere Ende des rechten Zweiwegkupplungsstückes muß über einen Silikonkautschukschlauch mit dem Einfülltrichter, das äußere Ende des linken Zweiwegkupplungsstückes über einen Silikonkautschukschlauch mit einer Absaugflasche verbunden werden, um eine gründliche Entleerung der Meßkammer und des zuführenden und abführenden Schlauchsystems zu erreichen. Die Elektroden werden mittels zweier Metallhalterungen auf der Grundplatte befestigt. Venylan-Verbindungsschläuche werden zwischen der Kühlkammer und dem mit aqua destillata gefüllten Thermostaten gelegt und die elektrische Verbindung zwischen den Kupferstabelektroden und der Stromabnahmequelle an der Oberfläche der Mikroskopsäule hergestellt.

3. Die Kühlvorrichtung

Die Temperatur der Meßkammer wird mittels eines Wassermantels konstant gehalten. Das die Meßkammer umgreifende Plexiglasgehäuse wird mit Wasser durchströmt, dessen Temperatur von einem Ultrathermostaten reguliert wird. Er hält die für die Versuchsreihen notwendige Beobachtungstemperatur von 23°C über einen längeren Zeitraum bis auf wenige tausendstel Grad konstant. Als Thermostatenflüssigkeit wurde destilliertes Wasser verwendet. Bei Arbeiten in diesem Temperaturbereich wurde die Kühlschlange an die Wasserleitung angeschlossen und für die Abkühlung der Thermostatenflüssigkeit Leitungswasser verwendet. Wird ohne Kühlung gearbeitet, so kann durch die Eigenerwärmung des Pumpenaggregats die eingestellte Temperatur nicht gehalten werden.

Temperaturveränderungen würden die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen beeinflussen, da sie den elektrischen Widerstand verändern. Untersuchungen haben gezeigt, daß es bei einer Temperaturerhöhung um 1°C zu einer Zunahme der Zellwanderungsgeschwindigkeit um 2 % kommt (Sachtleben). Als weitere Faktoren, die zu einer Temperaturerhöhung führen, müssen der Stromfluß, der durch Erwärmung der Meßflüssigkeit wirksam wird, - denn die Stromwärme steigt mit dem Quadrat der verwendeten Stromstärke - und die Wärmestrahlung der Mikroskopbeleuchtung genannt werden, die bei längerer Meßdauer eine Temperaturerhöhung in der Kammer bewirken würde.

4. Das optische System und die elektrischen Einrichtungen

Die Beobachtung der in der Meßkammer aufgeschwemmten Zellen erfolgt mit einem Mikroskop. Das hierzu eingebaute Spezialobjektiv hat den Vorteil, daß Objekte entweder nach dem Hellfeld- oder dem Phasenkontrast-Verfahren abgebildet werden.

Der Strahlengang durch die Kammer ist horizontal. Grob- und Feintrieb zur Einstellung des Bildes sind getrennt angebracht. Der Feintrieb ist mit einer Meßstrommel für Tiefenmessungen gekoppelt, an der direkt in 1/1000 mm abgelesen werden kann.

Der Binokulartubus hat einen unter 45° geneigten Einblick. Als Beobachtungsokulare wurden Kompensations-Planokulare von 12,5facher Vergrößerung verwendet. Eines davon enthält eine Spezialplatte, die so gestaltet ist, daß sie gleichzeitig als Mikrometerplatte und als Objektfinderplatte benutzt werden kann. Die Augenlinse dieses Okulars ist verstellbar, damit eine genaue Einstellung der Strichplatte möglich ist.

Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops ist 800fach. Die Seitenlänge eines Feldes des Netzmikrometers beträgt 1 mm. Sie entspricht im Objekt einer Strecke von 16 μm . Um bei der relativ starken Vergrößerung einen ausreichenden Abstand zur Einstellebene zu erreichen, ist die erste Objektivlinse gewissermaßen als Einblickfenster mit der Temperierkammer verbunden. Das bedeutet, daß Objektiv- und Temperierkammer stets gut zueinander zentriert sein müssen. Um das zu erreichen, ist auf der die Temperierkammer abschließenden Linse ein Justierkreis aufgetragen. Das Beobachtungsobjektiv ist von einem Schutzmantel umgeben, der eine versehentliche Berührung des Objektivs und der Linse verhindert.

Als Lichtquelle dient eine Nierdervoltleuchte von 6 V 15 W. Sie ragt hinten aus der Säule heraus, damit die anfallende

Wärme leicht abgeführt werden kann. Gleichzeitig stehen drei Filter zur Verfügung, ein Neutralfilter, der zur Lichtdämpfung dient, ein Blauglas zur Angleichung des Kunstlichtes an das Tageslicht und ein Grünfilter, der eine Kontraststeigerung ermöglicht.

Ein Konstantstromgerät versorgt die Elektroden und hält den angelegten Strom konstant. Da für die Zellelektrophoretischen Untersuchungen häufig ein Umpolen des elektrischen Feldes nötig ist, läßt sich an einem Kabelschalter die Stromrichtung wechseln.

5. Füllung der Meßkammer - die Meßflüssigkeit (Abb. 3)

Um vergleichbare bzw. reproduzierbare zellelektrophoretische Meßergebnisse zu erhalten, sind als Suspensionen nur dünnflüssige und relativ zellarme Lösungen verwendbar. Die Viskosität, die Leitfähigkeit und die Temperatur der Meßflüssigkeit müssen konstant gehalten werden. Diese Forderung gilt auch für die Menge der Meßflüssigkeit und des Meßgutes, da mit dem Meßgut Spuren von Serumelektrolyten und Bluteiweißen in die Suspensionslösung gebracht werden. Bei ungleichen Mengen resultiert eine veränderte Ionenstärke und somit eine Änderung der zellelektrophoretischen Beweglichkeit. Zum Ausschluß elektrolytischer Wirkungen an den Elektroden und zur Vermeidung von Konzentrationsänderungen der Ionen in der Suspensionslösung wurde die Stromrichtung nach jeder Messung gewendet.

Durch Erhöhung der Salzkonzentrationen in der Meßflüssigkeit wird das Oberflächenpotential vermindert. Die Wirksamkeit steigt mit der Wertigkeit der verwendeten Kationen. Untersuchungen ergaben, daß die Werte für die Beweglichkeit menschlicher Erythrocyten in Phosphaatlösungen um ca. 15 % höher lagen als bei Verwendung von Chloridlösungen (Seaman). Weiterhin war darauf zu achten, daß der spezifische Widerstand der Suspensionslösung bei den Messungen konstant gehalten wurde, da es durch eine Erhöhung des spezifischen Widerstandes bei sonst gleichen Bedingungen zu einer Beschleunigung der Zellen kommt. Das ist für den Zusatz der 3,8 %igen Natriumcitratlösung zum Blut zur Verhinderung der Gerinnung wichtig. Je mehr Natriumcitrat zugesetzt wird, um so niedriger ist der elektrische spezifische Widerstand der Mischung. Andererseits wird durch den Zusatz auch die Viskosität des Plasmas zunehmend verringert. Die Beweglichkeit der Zellen:

ist aber dem spezifischen Widerstand invers, der Viskosität direkt proportional, sodaß sich die beiden Änderungen weitgehend aber nicht völlig kompensieren. Da wir aber die zellelektrophoretischen Messungen nicht im Plasmamilieu, sondern in einer Aufschwemmungsflüssigkeit, die aus 100 Teilen 0,9 %iger NaCl-Lösung und 5 Teilen m/15 Phosphatpuffer bestand, durchführten, war eine konstante Zusammensetzung der Meßflüssigkeit besonders notwendig.

Vor der Messung wurde die Meßkammer mit 90 %iger Ameisensäure für etwa 10 Minuten über den rechten Einfülltrichter gefüllt. Bei starker Verschmutzung der Kammer (Proteinfilm an den Kammerwänden) mußte die Zeit auf 1 bis 2 Stunden ausgedehnt werden. Die Ameisensäure wurde über eine links angeschlossene Saugflasche abgesaugt, dann 1/2 bis 1 Stunde mit Leitungswasser, danach mit etwa 50 ml Alkohol und mit 50 ml Äther gespült und schließlich 10 Minuten Luft durchgeblasen. Mit Hilfe einer Injektionsspritze wurde physiologische NaCl-Lösung in die beiden Zwischenstücke der Elektroden eingespritzt, bis sie vollständig gefüllt waren. Das erfolgte durch kleine seitliche Bohrungen der Zwischenstücke. Nach dem Lösen der Fischklemmschraube wurde die Meßkammer im Uhrzeigersinn um etwa 45° gedreht und das Meßgut in den Trichter eingefüllt. Durch vorsichtiges Drehen gegen den Uhrzeigersinn wurde die Zellaufschwemmung luftblasenfrei in die Kammer gebracht, bis das Meßsystem bis zum Hahn hinter der linken Elektrode gefüllt war. Der Verbindungsschlauch zwischen dem Einfülltrichter und der Meßkammer wurde nun mit einer Klemme verschlossen, die Meßkammer durch Drehen im Uhrzeigersinn senkrecht gestellt und die meist vorhandenen Luftblasen durch Quetschen am Zuflußschlauch aus dem Kammer-system vollständig herausgedrückt. Dann wurde der obere Hahn geschlossen und das Meßsystem wieder waagrecht gestellt.

6. Fehlerquellen

Zuverlässige und vergleichbare Werte können mit einem Zellelektrophoreseapparat nur gewonnen werden, wenn eine Standardtechnik eingehalten wird. Die Verfälschung von Meßergebnissen durch technische Störungen ist bei der Arbeit mit dem Hämozytopherometer relativ groß. Das Auftreten von meßbaren Streuwerten stärkeren Ausmaßes ist immer ein Hinweis auf Störungen bzw. Strömungen in der Meßapparatur, die die häufigsten Fehlerquellen bei den Messungen darstellen. Sie können mehrere Ursachen haben:

a) Strömungen aufgrund von Konvektion.

Sie erfolgten durch Temperaturunterschiede im Bereich der Meßkammer, wenn z.B. das eingefüllte Untersuchungsgut eine andere Temperatur hatte als das Glas der Kammer. Weiterhin können Temperaturunterschiede auftreten, wenn das Zellmaterial, das erst kurz vor Beginn der Untersuchung mit der Suspensionsflüssigkeit gemischt wird, eine andere Temperatur hat als die Flüssigkeit. Eine ungleichmäßige Erwärmung wird ferner durch die Mikroskopierlampe verursacht, deren Licht deshalb durch mehrere Filterscheiben an der Mikroskopierlampe gefiltert wird. Die bei stärkerem Stromfluß freiwerdende Joulesche Wärme kann zu erheblichen Störströmungen führen. Deshalb ist es unbedingt notwendig, die Joulesche Wärme so niedrig wie möglich zu halten.

b) Strömungen aufgrund von Hydrostase.

Diese Störströmungen, die bei der senkrechten Anordnung der Meßkammer während der Beobachtung der Partikel und während der Messung ihrer Wanderungsgeschwindigkeit auftreten können, lassen sich durch eine streng symmetrische Apparaturanordnung verhindern.

Fehlerhafte Messungen treten auch dann auf, wenn die Wanderungsgeschwindigkeit nicht konsequent in den stationären Ebenen gemessen wird. Fehlermöglichkeiten im Sinne eines überhöhten Widerstandes oder einer völligen Unterbrechung des Stromflusses können durch Luftbläschen im Meßsystem oder durch überflüssiges Fett an den Hähnen entstehen. Das optische System muß in allen Bereichen exakt eingestellt werden.

Die Zellauswahl durch den Untersucher kann zu erheblichen Abweichungen in der Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen führen, wenn nicht streng darauf geachtet wird, daß nur scharf abgebildete Zellen gemessen werden.

Rückstände vom Spülwasser, Alkohol-, Äther-, Säurereste, ungleichmäßige Verteilung eines Eiweißfilms an den Kammerinnenwänden, Beimischungen von Detritus, zu dichte Zellsuspensionen, Zellverklumpungen und Gelatineverunreinigungen können häufige Ursachen der Verfälschung von Meßergebnissen sein.

IV. Die elektrophoretische Beweglichkeit und ihre Berechnung

Zur Beurteilung der Zellwanderung im elektrischen Feld ist die Kenntnis der Ionenstärke, der Wasserstoffionenkonzentration, der elektrischen Leitfähigkeit, der Viskosität und der Temperatur der Meßflüssigkeit notwendig (Heard und Seaman; Ruhenstroth-Bauer und Sachtleben). Bei Verwendung isotoner Pufferlösungen erübrigen sich laufende Leitfähigkeits- oder Viskositätsbestimmungen vor jeder Messung, da die Werte eingestellt bzw. konstant sind. Wir bestimmten die genormte Wanderungsgeschwindigkeit. Sie wurde auf die Feldstärke 1 und die Wasserviskosität genormt. Die elektrophoretische Beweglichkeit wird in $\mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ angegeben. Die eigentliche Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$B = \frac{\frac{1}{t}}{E}$$

Hierbei bedeuten:

l = Strecke (cm), die das untersuchte
Teilchen während der Messung zu-
rückgelegt hat

t = Zeit (sec), die das Teilchen für die
Zurücklegung von l gebraucht hat

E = Feldstärke

Die Feldstärke wird errechnet nach der Formel:

$$E = \frac{I \times l}{h \times b} = 10^{-4} \text{ (cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}\text{)}$$

Hierbei bedeuten:

I = Stromstärke (A)

ρ = Spezifischer Widerstand des
Aufschwemmungspuffers ($\Omega \text{ cm}$)

h = Höhe der Meßkammer (cm)

b = Tiefe der Meßkammer (cm)

Bei der Bestimmung von Absolutwerten der elektrophoretischen Beweglichkeit von Teilchen muß auch die Viskosität der Aufschwemmungsflüssigkeit berücksichtigt werden; für das Hämozytopherogramm sind jedoch nur die Relativwerte zwischen den elektrophoretischen Beweglichkeiten der einzelnen zu untersuchenden Reihen notwendig.

Die Linienabstände im Okularmeßgitter betragen 1000μ , die Abstände bei den senkrechten Strichen der Vorderwand und den waagerechten Strichen der Hinterwand der Meßkammer 80μ . Ein Linienabstand an der Vorderwand der Meßkammer fällt auf 5 Linienabstände des Okularmeßgitters. Es entsprechen also 80μ des Objekts an der Vorderwand $5 \times 1000\mu$ im Okular. Eine Zelle wandert deshalb, wenn sie im Okularmeßgitter von einer Linie zur nächsten läuft, an der Vorderwand der Meßkammer $80 : 5,0 = 16,0\mu$.

V. Eigene Versuche

1. Durchführung

Das Krankengut stammte aus der Diabetikerzentrale der Ortskrankenkasse Berlin.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir Diabetikerseren von Patienten, die nach genauem Studium der Akten als schwer mit Insulin einstellbar zu bezeichnen waren.

Parallel verlaufend mit dem Nachweis zirkulierender Insulin-Antikörper durch vergleichende Messungen der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der von uns hergestellten Versuchsreihen wurde als Kontrollversuch zum serologischen Nachweis der Antikörper die passive oder indirekte Hämagglutinationsreaktion nach Boyden durchgeführt.

Bei den 30 insulinempfindlichen Diabetikern - der Insulinbedarf schwankte zwischen 40 und 80 E/die - deren Seren analysiert wurden, handelte es sich um Diabetiker, die über längere Zeit mit Rinder- bzw. Schweine-Insulin vorbehandelt waren. Sie wurden von der Diabetikerzentrale eingestellt. 30 % waren aber vorher zeitweise in stationärer Behandlung aufgrund einer unausgeglichene Stoffwechsellaage. Wir fanden eine Altersverteilung zwischen 17 und 72 Jahren. Die Blutentnahmen erfolgten an nüchternen Patienten vor der morgendlichen Insulingabe, um die Abbindung zirkulierender Antikörper durch therapeutisch verabfolgtes Insulin möglichst gering zu halten. Dieser Zeitfaktor ist wichtig, da der Antikörper nicht nachweisbar sein kann, solange er an Insulin gebunden ist (Arquilla und Stavitsky).

2. Technik

Zur Herstellung der Versuchsreihen wurde folgendes Verfahren durchgeführt.

Die Erythrocyten wurden von frischem Blut gesunder Spender gewonnen. Nach dreimaligem Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung bei 1500 g für jeweils 5 Minuten wurde eine 2 %ige Erythrocytenaufschwemmung hergestellt. Anschließend wurde sie mit einer Tanninlösung 1 : 20 000 versetzt und 30 Minuten bei 37° C gehalten. Durch zweimaliges Waschen ist das nicht adsorbierte Tannin entfernt worden. Das Erythrocytensediment wurde nun mit 0,15 ml = 6 IE Rinder- bzw. Schweineinsulin (Farbwerke Hoechst AG) versetzt und bei 37° C eine halbe Stunde und anschließend bei 4° C eine Stunde inkubiert. Danach ist das überschüssige Insulin durch mehrmaliges Waschen entfernt worden. Diese Suspension wurde mit 0,25 ml des zu untersuchenden Patientenserums versetzt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur gelagert. Das Serum wurde vor der Verwendung 30 Minuten bei 56° C im Wasserbad zur Zerstörung des Komplements belassen. Im Anschluß daran wurde zur Pufferlösung, die uns als Aufschwemmungsflüssigkeit diente, so viel von der hergestellten Lösung zugesetzt, daß eine 0,1 %ige Suspension entstand. Die Pufferlösung wurde aus 100 Teilen 0,9 %iger NaCl-Lösung und 5 Teilen M/15 Phosphatpufferlösung hergestellt. Ihr pH-Wert betrug 7,2, ihr elektrischer Widerstand 73 Ω cm.

Mit den Messungen wurde sofort nach dem Ansetzen der Aufschwemmung begonnen. Nach Einschalten des Meßstromes von 4 mA wurde mit einer Stoppuhr die Zeit bestimmt, in der die in der vorderen stationären Ebene scharf sichtbaren Erythrocyten senkrechte Striche des Okularmeßgitters in einer Richtung kreuzten. Als Beobachtungspunkt wurde das Zentrum der Zelle gewählt. Anschließend wurde die Stromrichtung gewechselt und die Zeit gemessen, die die gleiche Zelle in dieser

Richtung benötigt. Die Zeiten müssen nahe beieinander liegen. Bei einer Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit nach dem Umpolen wurde die Messung sofort unterbrochen und die Stromschwankung korrigiert. In dieser Weise wurden etwa 30 Erythrocyten der jeweiligen Versuchsreihe untersucht.

Die Meßzeit betrug zwischen 5 und 40 Sekunden. Alle Messungen wurden bei 23° C ausgeführt. Von folgenden Versuchsreihen bestimmten wir die Werte für die elektrophoretische Beweglichkeit:

- a) Humane Erythrocyten
- b) Tannisierte humane Erythrocyten
- c) Tannisierte humane Erythrocyten konjugiert mit Rinder-Insulin
- d) Tannisierte humane Erythrocyten konjugiert mit Schweine-Insulin
- e) Tannisierte humane Erythrocyten konjugiert mit Rinder-Insulin bei Zugabe von Patientenserum. Hämagglutinationstest: positiv bzw. negativ
- f) Tannisierte humane Erythrocyten konjugiert mit Schweine-Insulin bei Zugabe von Patientenserum. Hämagglutinationstest: positiv bzw. negativ

VI. Kasuistik

Von den 30 untersuchten Diabetikern haben wir 6 Fälle ausgewählt, bei denen sich der Insulinbedarf in unterschiedlichen Zeitabständen steigerte.

Protokoll-Nr. 3

Abb. 4

Jürgen P., 24 Jahre

Diabetes mellitus seit 1963

Insulinbedarf bei Ersteinstellung 20 E/die

Insulinbedarf heute 64 E/die

Protokoll-Nr. 10

Abb. 5	Detlef M., 17 Jahre	
	Diabetes mellitus seit 1967	
	Insulinbedarf bei Ersteinstellung	24 E/die
	Insulinbedarf heute	56 E/die

Protokoll-Nr. 12

Abb. 6	Hertha K., 72 Jahre	
	Diabetes mellitus seit 1949	
	Insulinbedarf bei Ersteinstellung	16 E/die
	Insulinbedarf heute	88 E/die

Protokoll-Nr. 13

Abb. 7	Ella S., 62 Jahre	
	Diabetes mellitus seit 1959	
	Insulinbedarf bei Ersteinstellung	24 E/die
	Insulinbedarf heute	76 E/die

Protokoll-Nr. 16

Abb. 8	Gisela S., 37 Jahre	
	Diabetes mellitus seit 1959	
	Insulinbedarf bei Ersteinstellung	16 E/die
	Insulinbedarf heute	72 E/die

Protokoll-Nr. 20

Abb. 9	Margarete v. D., 60 Jahre	
	Diabetes mellitus seit 1953	
	Insulinbedarf bei Ersteinstellung	20 E/die
	Insulinbedarf heute	76 E/die

Die Protokoll-Nummern 3, 10, 12, 13, 16 und 20 erscheinen nicht mehr in den Tabellen 1 bis 8, weil die Werte der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Versuchsreihen von diesen 6 ausgewählten Fällen in den Abbildungen 4 bis 9 in Form von sogenannten Hämozytogrammen dargestellt werden.

VII. Ergebnisse

Untersucht wurden 30 Seren von insulinbedürftigen Diabetikern. In 19 Fällen konnten durch vergleichende Messungen der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit zirkulierende Antikörper gegen Rinder-Insulin und in 12 Fällen Antikörper gegen Schweine-Insulin nachgewiesen werden.

Der serologische Nachweis der zirkulierenden Antikörper gegen Rinder-Insulin mit der passiven Hämagglutinationsreaktion nach Boyden zeigte in 19 Fällen ein positives Resultat; Antikörper gegen Schweine-Insulin konnte nur in 12 Fällen nachgewiesen werden.

Die verwendeten humanen Erythrocyten wiesen eine Beweglichkeit zwischen $1,138$ und $1,342 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ auf, bei Standardabweichungen im Bereich von $s = 0,012$ und $s = 0,036$.

Tanninvorbehandelte humane Erythrocyten wanderten zwischen $0,910$ und $1,208 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, mit Werten für $s = 0,012$ bis $s = 0,044$.

Bei tannisierten humanen Erythrocyten, die mit Rinder-Insulin konjugiert waren, kam es zu einer Verminderung der elektrophoretischen Beweglichkeit gegenüber tannisierten humanen Erythrocyten um etwa 11 %, mit Standardabweichungen zwischen $s = 0,017$ und $s = 0,024$; nach Schweine-Insulin-Konjugation war eine stärkere Verminderung und zwar um etwa 24 % zu verzeichnen, bei Standardabweichungen zwischen $s = 0,016$ und $s = 0,031$.

Nach Behandlung der tannisierten humanen Erythrocyten - die mit Rinder-Insulin konjugiert waren - mit Patientenserum, erfolgte bei positivem Ausfall der Hämagglutinationsreaktion eine Verminderung der Beweglichkeit im elektrischen Feld gegenüber denen ohne Zusatz von Patientenserum um 43 %, bei Schweine-Insulin-Konjugation um 34 %.

Nach Zugabe von Patientenserum und bei negativem Häm-agglutinationstest fand sich nur eine geringe Abweichung der Wanderungsgeschwindigkeit von der der tannisierten humanen Erythrocyten sowohl bei Rinder-Insulin-Bindung als auch bei Schweine-Insulin-Bindung.

In den Abbildungen 4 - 9 werden die Werte der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Versuchsreihen von 6 ausgewählten Fällen in besonderen Diagrammen, den sogenannten Hämozytopherogrammen, dargestellt. Die restlichen 24 untersuchten Fälle werden in den Tabellen 1 - 8 demonstriert.

Beim Hämozytopherogramm gibt die Abszisse die elektrophoretische Beweglichkeit in $\mu/\text{sec/V/cm}$ an, die Ordinate stellt die Zahl der untersuchten Zellen dar.

Die oberhalb und unterhalb der Abszisse abgebildeten Dreiecke geben die gefundenen Werte der elektrophoretischen Beweglichkeit der einzelnen Zellfraktionen wieder. Die Spitze dieser Dreiecke steht über dem errechneten Mittelwert $\bar{a}$ ($\mu/\text{sec/V/cm}$). Die Basis auf der Abszisse bildet den Raum für die Streuung der einzelnen Beweglichkeitswerte.

Die statistisch errechnete Standardabweichung wird mit s angegeben. Sie hat die gleiche Dimension wie die Ursprungswerte.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (a_i - \bar{a})^2}{n - 1}$$

Erläuterungen zu den Tabellen 1 - 8 (S. 31 - 38)

Versuchsreihen:

- 1) Humane Erythrocyten
- 2) Tannisierte humane Erythrocyten
- 3) Tannisierte humane Erythrocyten konjugiert mit Rinder-Insulin
- 4) Tannisierte humane Erythrocyten konjugiert mit Schweine-Insulin
- 5 + 6) Tannisierte humane Erythrocyten konjugiert mit Rinder-Insulin bei Zugabe von Patientenserum
- 7 + 8) Tannisierte humane Erythrocyten konjugiert mit Schweine-Insulin bei Zugabe von Patientenserum

$\bar{a}$ = errechneter Mittelwert der elektrophoretischen Beweglichkeit der einzelnen Zellfraktionen (gemessen in μ /sec/V/cm)

s = statistisch berechnete Standardabweichung

Tabelle 1

Protokoll- Nr.	Versuchs- reihe	$\bar{a}$	s	Hämagglutinations- test
1	1	1.164	0.021	positiv negativ negativ
	2	0.970	0.020	
	3	0.928	0.023	
	4	0.784	0.019	
	5	0.832	0.025	
	6	0.922	0.022	
	7	0.757	0.031	
2	1	1.182	0.029	positiv negativ positiv negativ
	2	0.955	0.018	
	3	0.933	0.024	
	4	0.807	0.021	
	5	0.795	0.031	
	6	0.904	0.027	
	7	0.729	0.018	
	8	0.772	0.025	
4	1	1.189	0.021	negativ negativ
	2	0.976	0.032	
	3	0.904	0.025	
	4	0.833	0.029	
	5	0.873	0.021	
	7	0.804	0.030	

Tabelle 2

Protokoll-Nr.	Versuchsreihe	$\bar{a}$	s	Hämagglutinationstest
5	1	1.125	0.027	
	2	0.995	0.021	
	3	0.915	0.024	
	4	0.852	0.019	
	5	0.821	0.017	positiv
	6	0.908	0.026	negativ
	7	0.769	0.027	positiv
	8	0.828	0.031	negativ
6	1	1.263	0.037	
	2	1.031	0.041	
	3.	0.942	0.024	
	4	0.861	0.026	
	5	0.839	0.029	positiv
	6	0.891	0.021	negativ
	7	0.851	0.031	negativ
7	1	1.193	0.035	
	2	1.096	0.028	
	3	0.971	0.022	
	4	0.769	0.032	
	5	0.923	0.027	negativ
	7	0.732	0.039	negativ

Tabelle 3

Protokoll-Nr.	Versuchsreihe	$\bar{a}$	s	Hämagglutinationstest
8	1	1.065	0.041	negativ negativ
	2	1.019	0.021	
	3	0.972	0.030	
	4	0.758	0.027	
	5	0.917	0.036	
	7	0.739	0.028	
9	1	1.135	0.026	positiv negativ negativ
	2	1.031	0.024	
	3	0.994	0.032	
	4	0.856	0.031	
	5	0.845	0.021	
	6	0.939	0.027	
	7	0.831	0.039	
11	1	1.052	0.034	negativ negativ
	2	1.037	0.028	
	3	0.976	0.024	
	4	0.763	0.031	
	5	0.947	0.042	
	7	0.734	0.038	

Tabelle 4

Protokoll- Nr.	Versuchs- reihe	$\bar{a}$	s	Hämagglutinations- test
14	1	1.132	0.027	positiv negativ positiv negativ
	2	1.015	0.023	
	3	0.947	0.031	
	4	0.746	0.029	
	5	0.793	0.022	
	6	0.925	0.021	
	7	0.649	0.032	
	8	0.729	0.027	
15	1	1.057	0.037	negativ negativ
	2	1.011	0.020	
	3	0.871	0.018	
	4	0.778	0.022	
	5	0.813	0.024	
	7	0.742	0.031	
17	1	1.088	0.021	positiv negativ positiv negativ
	2	1.015	0.018	
	3	0.963	0.027	
	4	0.824	0.022	
	5	0.812	0.023	
	6	0.901	0.031	
	7	0.742	0.030	
	8	0.793	0.025	

Tabelle 5

Protokoll-Nr.	Versuchsreihe	$\bar{a}$	s	Hämagglutinationstest
18	1	1.172	0.018	
	2	1.081	0.029	
	3	0.941	0.031	
	4	0.873	0.027	
	5	0.902	0.025	negativ
	7	0.841	0.024	negativ
19	1	1.141	0.023	
	2	1.047	0.021	
	3	0.974	0.031	
	4	0.794	0.025	
	5	0.792	0.026	positiv
	6	0.891	0.025	negativ
	7	0.654	0.021	positiv
	8	0.753	0.020	negativ
21	1	1.203	0.023	
	2	1.124	0.031	
	3	0.954	0.022	
	4	0.831	0.025	
	5	0.810	0.032	positiv
	6	0.892	0.029	negativ
	7	0.781	0.025	negativ

Tabelle 6

Protokoll-Nr.	Versuchsreihe	$\bar{a}$	s	Hämagglutinationstest
22	1	1.193	0.025	positiv negativ negativ
	2	1.117	0.041	
	3	1.021	0.027	
	4	0.903	0.019	
	5	0.812	0.024	
	6	0.991	0.022	
	7	0.854	0.032	
23	1	1.152	0.021	negativ negativ
	2	1.061	0.029	
	3	0.932	0.024	
	4	0.841	0.031	
	5	0.893	0.024	
	6	0.822	0.034	
	7	0.822	0.034	
24	1	1.213	0.025	negativ negativ
	2	1.154	0.027	
	3	1.052	0.020	
	4	0.928	0.031	
	5	0.953	0.034	
	6	0.867	0.021	
	7	0.867	0.021	

Tabelle 7

Protokoll-Nr.	Versuchsreihe	$\bar{a}$	s	Hämagglutinations-test
25	1	1.142	0.031	positiv negativ negativ
	2	1.085	0.024	
	3	0.947	0.021	
	4	0.863	0.034	
	5	0.857	0.029	
	6	0.914	0.025	
	7	0.821	0.021	
26	1	1.129	0.018	positiv negativ positiv negativ
	2	1.067	0.023	
	3	0.976	0.027	
	4	0.912	0.031	
	5	0.841	0.040	
	6	0.915	0.025	
	7	0.842	0.027	
	8	0.893	0.021	
27	1	1.193	0.027	positiv negativ positiv negativ
	2	1.152	0.031	
	3	0.997	0.025	
	4	0.913	0.022	
	5	0.898	0.032	
	6	0.967	0.024	
	7	0.841	0.032	
	8	0.893	0.029	

Tabelle 8

Protokoll-Nr.	Versuchsreihe	$\bar{a}$	s	Hämagglutinationstest
28	1	1.113	0.027	
	2	1.054	0.037	
	3	0.944	0.025	
	4	0.893	0.020	
	5	0.907	0.024	negativ
	7	0.809	0.024	positiv
	8	0.872	0.035	negativ
29	1	1.173	0.032	
	2	1.127	0.034	
	3	1.042	0.025	
	4	0.931	0.031	
	5	0.952	0.031	negativ
	7	0.893	0.024	negativ
30	1	1.209	0.027	
	2	1.131	0.031	
	3	0.964	0.025	
	4	0.907	0.027	
	5	0.854	0.021	positiv
	6	0.905	0.031	negativ
	7	0.832	0.020	positiv
	8	0.891	0.027	negativ

VIII. Diskussion

Die Anwendungsmöglichkeiten der Zellelektrophorese erstrecken sich auf die Kennzeichnung von Zellen, auf den Nachweis von Zelloberflächenveränderungen nach irgendwelcher Einwirkung, auf den Vergleich zwischen Zellen und auf die Kennzeichnung von Viren und ähnlichen Partikeln bei der Verwendung von Zelloberflächen als spezifische Adsorbentien.

Als Beispiel für die Kennzeichnung von Zellen sei die elektrophoretische Beweglichkeit von Säugerythrocyten angeführt (Fritze und Doering; Angers und Rottino; Sachtleben und Mitarbeiter; Fritze; Arnold). Weiterhin wurden Beweglichkeitsreihen von Leukocyten und Granulocyten gesunder und kranker Menschen aufgestellt (Ruëff).

Es gelang, Oberflächenveränderungen an Bakterien nach chemischer und enzymatischer Behandlung, so z.B. bei *Aerobacter aerogenes* und *Streptococcus pyogenes*, durch Aufstellung von elektrophoretischen Beweglichkeitsreihen zu zeigen (James). Auch zur Charakterisierung von Spermien ist das Verfahren geeignet (Bey).

Mit Hilfe der Zellelektrophorese kann eine Proteinadsorption an Erythrocyten bewiesen werden. Piper und Ruhenstroth-Bauer verwendeten dazu das Hämoglobin.

Zellelektrophoretische Untersuchungen von Erythrocyten, die mit Antikörpern des ABO- und MN-Systems besetzt wurden, zeigten eine Verminderung der elektrophoretischen Beweglichkeit. Dagegen veränderte sich die elektrophoretisch meßbare elektrische Ladung der Erythrocyten nicht, wenn ihre Oberfläche von Antikörpern des Rh-Systems besetzt wurde (Sachtleben und Ruhenstroth-Bauer). Untersuchungen über die Einwirkungen von Fermenten auf die Oberfläche der Erythrocyten und somit auf ihre Beweglichkeit im elektrischen Feld sind ebenfalls schon durchgeführt worden (Ponder; Piper).

Der Vergleich der Zellbeweglichkeit bei der Ausreifung der Leukocyten wurde von Bangham und Mitarbeitern verfolgt.

Sachtleben und Straub behandelten Hühnererythrocyten mit Virus der klassischen Geflügelpest und untersuchten sie auf Veränderungen ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit. Das Potential der Erythrocytenoberfläche - und damit die Beweglichkeit im elektrischen Feld - wurde nach Adsorption der Virus vermindert.

Wie bei jeder Antigen-Antikörper-Reaktion kann beim zell-elektrophoretischen Nachweis der Antikörper bestimmt werden, wenn das Antigen bekannt ist, d.h. die Erythrocyten mit dem Virus besetzt worden sind. Das Zellpotential verminderte sich nach spezifischem Antikörperbesatz der Virusbeladenen roten Blutkörperchen (Sachtleben und Straub).

Da die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von Erythrocyten in Abhängigkeit von der negativen Überschußladung ihrer Oberfläche steht, erhebt sich die Frage nach der Art der negativen Gruppen, die die Wanderung der Zellen im elektrischen Feld bedingen. Es soll sich um Phosphorsäuregruppen von Lipoiden handeln (Furchgott und Ponder). Die Autoren hatten Lipoid- und Proteinextrakte aus Erythrocytenschatten hergestellt und deren Beweglichkeit als Funktion des pH untersucht. Die Beweglichkeitskurve der Lipoide war derjenigen von Erythrocyten sehr nahe, sodaß die Verfasser zu obigem Schluß kamen. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Bangham und Mitarbeiter. Sie adsorbierten die Proteine und Lipoide an Glaspartikel und maßen deren Wanderungsgeschwindigkeit vor und nach Behandlung mit verschiedenen Salzen.

Die Änderungen nach Salzeinwirkung wurden mit parallel behandelten Erythrocyten verglichen. Sie führten ebenfalls zu der Annahme, daß Phosphorsäuregruppen entscheidend für die Beweglichkeit der Erythrocyten sind. Die Vorstellung einer sol-

chen Kausalität steht jedoch mit dem Befund von Piper im Widerspruch. Er konnte durch zellelektrophoretische Untersuchungen zeigen, daß die negative Überschußladung der Erythrocyten zum Teil durch Neuraminsäure bedingt ist, indem er durch Behandlung mit dem Ferment Neuraminidase, das endständige Neuraminsäure abzuspalten vermag, eine Verminderung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Erythrocyten um mehr als die Hälfte erzielte. Cook und Mitarbeiter bestätigten später diese Beobachtungen,

Demnach muß die Bindung von Antikörpern an die Oberfläche von Erythrocyten mit einer Entladung der Zellen einhergehen, indem negative Gruppen abgedeckt oder neutralisiert werden. Durch diesen Vorgang würde die negative Überschußladung der Oberfläche der roten Blutkörperchen vermindert werden. Die Folge wäre eine Verringerung der elektrophoretischen Beweglichkeit und zwar um so stärker, je mehr negative Gruppen für die Bruttoladung der Zelloberfläche ausfallen.

Schon durch die Behandlung der Erythrocyten mit dem organischen Stoff Tannin, das sich reversibel an das Protein der Oberfläche bindet, erfolgte eine deutliche Abnahme ihrer Wanderungsgeschwindigkeit. Nach anschließender Schweine- bzw. Rinder-Insulin-Konjugation konnten wir eine weitere Beweglichkeitsminderung der tanninvorbehandelten Erythrocyten beobachten, die bei Schweine-Insulin-Bindungen stärker war. Wo im Serum Insulin-Antikörper durch den Hämagglutinationstest nachgewiesen werden konnten, betrug die Herabsetzung der Wanderungsgeschwindigkeit bei Zusatz des antikörperhaltigen Serums zu tannisierten humanen Erythrocyten, die Rinder-Insulin gebunden hatten, maximal 43 % - verglichen mit den gemessenen Werten für den Tannin-Erythrocyten-Rinder-Insulinkomplex. Da dieser Komplex nach Zugabe von Patientenserum bei negativem Hämagglutinationstest nur eine geringe Beweglichkeits-

änderung zeigte, ist die starke Abnahme der Wanderungsgeschwindigkeit auf eine Besetzung der tannisierten, mit Rinder-Insulin konjugierten Erythrocyten mit Insulin-Antikörpern zurückzuführen. Zu demselben Ergebnis kamen wir bei Verwendung von Schweine-Insulin als Antigen, wenn serologisch Antikörper gegen Schweine-Insulin nachgewiesen werden konnten. Hier betrug die maximale Verminderung der elektro-phoretischen Beweglichkeit 34 %.

Die größenordnungsmäßig geringen Unterschiede zwischen den Wanderungsgeschwindigkeiten der tanninbehandelten Erythrocyten bei Insulin-Konjugierung und denen nach zusätzlicher Serumgabe bei negativem Hämagglutinationstest gemessenen sind auf das Serum zurückzuführen (Sachtleben; Sachtleben und Ruhenstroth-Bauer).

IX. Zusammenfassung

1. Mit der Zellelektrophorese konnten durch Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeiten von tanninvorbehandelten humanen Erythrocyten, die mit Rinder- bzw. Schweine-Insulin als Antigen konjugiert waren, zirkulierende Insulin-Antikörper in Seren von Diabetikern nachgewiesen werden.

Nach Besetzung der vorbehandelten Erythrocyten mit Antikörpern gegen Rinder-Insulin kam es zu einer Verminderung der elektrophoretischen Beweglichkeit von maximal 43 % - nach Bindung von Antikörpern gegen Schweine-Insulin von maximal 34 %.

Zum serologischen Nachweis der Insulin-Antikörper zeigte sich die passive oder indirekte Hämagglutinationsreaktion nach Boyden als Kontrollversuch geeignet.

2. Bei bekanntem Antigen ermöglicht die Größe der Wandlungsgeschwindigkeit, die in direkter Abhängigkeit zur Menge des einwirkenden Antikörpers steht, gleitende Mengenbestimmungen. Dadurch hat die Zellelektrophorese den Vorteil gegenüber den von anderen Autoren durchgeführten Verfahren, denn mit diesen Methoden lassen sich nur Stufenwerte bestimmen (Pfeiffer und Ditschuneit; Jones und Cunliff; Pav, Jezkova und Skrha; Poyden; Robinson und Wright; Wright; Berson und Mitarbeiter; Skom und Talmage; Kerp und Mitarbeiter).

X. Literaturverzeichnis

1. J. Angers and A. Rottino
The electrophoretic mobility of red blood cells of normal human beings.
Blood 17, 119 (1961)
2. R. Arnold
Pathological Hemocytopherograms of Rats and Mice.
Cell Electrophoresis, ed. E.J. Ambrose, J. & A. Churchill Ltd., London 1965
3. E.R. Arquilla and A.B. Stavitsky
The production and identification of antibodies to insulin and their use in assaying insulin.
J. Clin. Invest. 35, 458 (1956)
4. A.B. Bangham, B.A. Pethica and G.V. Seaman
The charged groups at the interface of some blood cells.
Biochem. J. (London) 69, 12 (1958)
5. H. Bemm
Insulinresistenz und Insulinantikörper.
Dtsch. Zeitschr. f. Verdauungs- u. Stoffwechselkrankheiten 27, 61 (1967)
6. H. Bemm, H.-O. Kluge, D. Lohmann, W. Rotzsch und A. Schäfer
Zur Behandlung der chronischen Insulinresistenz.
Münch. med. Wschr. 110, 2780 (1968)
7. S.A. Berson and R.S. Yalow
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody.
J. Clin. Invest. 38, 1996 (1959)
8. S.A. Berson, R.S. Yalow, A. Bauman, M.A. Rotschild and K. Newerly
Insulin-131-I Metabolism in Human Subjects: Demonstration of insulin Binding Globulin in the Circulation of Insulin Treated Subjects.
J. Clin. Invest 35, 170 (1956)

9. E. Bey
The Electrophoretic Mobility of Sperm Cells.
Cell electrophoresis (London 1965)
10. St. V. Boyden
The adsorption of proteins on erythrocytes treated with
tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein
sera.
J. Exper. Med. 93, 107 (1951)
11. G.M. Cook, D.H. Heard and G.V. Seaman
Sialic acids an the electrokinetic charge of human
erythrocyte.
Nature 191, 44 (1961)
12. H. Ditschuneit und K. Federlin
Beitrag zur Pathogenese der Insulinresistenz.
Dtsch. med. Wschr. 91, 853 (1966)
13. S. Fankhauser und F.C. Goetz
Zur Bedeutung der Insulinantikörper für das klinische
Verhalten des Diabetes mellitus.
Helvetia Medica Acta 28, 496 (1961)
14. E. Fritze
Die elektrische Ladung suspendierter Zellen.
Die naturwissenschaften 39, 25 (1952)
15. E. Fritze und P. Doering
Die elektrische Ladung und der isoelektrische Punkt der
Blutzellen und deren Beziehung zur Zellfunktion.
Klin. Wschr. 30, 19 (1952)
16. R.H. Furchgott and E. Ponder
Electrophoretic studies on human red cells.
J. Gen. Physiol. 24, 447 (1941)

17. P. Grabar
Die Immunopathologie in Klinik und Forschung.
2. Auflage (Stuttgart 1962)
18. D.H. Heard and G.V. Seaman
The influence of pH and ionic strength on the electrokinetic stability of the human erythrocyte membrane.
J. Gen. Physiol. 43, 635 (1960)
19. A.M. James
The Modification of Bacterial Surface Structures by
Chemical and Enzymatic Treatments.
Cell electrophoresis (London 1965)
20. V.E. Jones and A.C. Cunliff
A Precipitating Antibody to Insulin.
Nature 192, 136 (1961)
21. L. Kerp, H. Kasemir und F. Kielsing
Insulinbindende Antikörper und Insulinbedarf bei
Diabetikern.
Klin. Wschr. 46, 376 (1968)
22. L. Kerp, F. Kielsing und H. Kasemir
Zur Lokalisation von Antikörper-Bindungsstellen
an homologen Insulin-Molekülen.
Die Naturwissenschaften 54, 368 (1967)
23. L. Kerp und Mitarbeiter
Antikörperbindungsstellen am Insulinmolekül.
Verh. dtsch. Ges. Inn. Med. 74, 555 (1968)
24. L. Kerp, S. Steinhilber und H. Kasemir
Ein Verfahren zum Nachweis insulinbindender Antikörper
durch Differentialadsorption.
Klin. Wschr. 44, 560 (1966)
25. L. Kerp, S. Steinhilber, F. Kielsing und W. Creutzfeldt
Klinische und experimentelle Untersuchungen zur
Insulinallergie und Insulinresistenz.
Dtsch. Med. Wschr. 90, 806 (1965)

26. F. Kielsing
Verh. Dtsch. Ges. Allergie und Immunitätsforschung.
Bd. 2, (Stuttgart 1966)
27. S. Lukiewicz and W. Korohoda
Some Recent Advances in the Techniques of Cell
Microelectrophoresis.
Cell electrophoresis (London 1965)
28. A.M. Mancini, G.A. Zampa, A. Vecchi and G. Costanzi
Histoimmunological techniques for detecting anti-insulin
antibodies in human sera.
The Lancet II, 1189 (1965)
29. H.-W. Meyer
Über die Bindung von Rinder- und Schweineinsulin durch
zirkulierende Antikörper im Serum von Diabetikern.
Med. Welt 33, 1758 (1968)
30. H. Michel
Insulinallergie und Insulinresistenz.
Der Internist 3, 728 (1962)
31. H.-J. Mitzkat
Insulinallergie und Insulinresistenz.
Deutsches Medizinisches Journal 20, 676 (1969)
32. J. Pav, Z. Jezkova and F. Skrha
Insulin Antibodies.
The Lancet II, 221 (1963)
33. P. Petrides
Insulin-Therapie.
Münch. med. Wschr. 27, 1287 (1970)
34. E.F. Pfeiffer und H. Ditschuneit
Aktuelle Probleme der Diabetestherapie.
Dtsch. med. Wschr. 87, 2290 (1962)

35. W. Piper
 Untersuchungen über die Wirkung des "Receptor-Destroying-Enzyme" auf menschliche Erythrocyten.
 Acta Haemat. (Basel) 18, 414 (1957)
36. W. Piper und G. Ruhenstroth-Bauer
 Untersuchungen über die Proteinadsorption an menschlichen Erythrocyten.
 Klin. Wschr. 34, 11 (1956)
37. E. Ponder
 Effects produced by Trypsin on certain properties of human red cell..
 Blood 6, 350 (1951)
38. J.-G. Rausch-Stroomann und A. Sauer
 Zur Frage der Insulinresistenz durch Antikörperbildung.
 Klin. Wschr. 31, 551 (1953)
39. F. Rueff
 Die Zellelektrophorese in der klinischen Diagnostik.
 (München 1964)
40. B.H.B. Robinson and P.H. Wright
 Guinea-Pig Anti-Insulin Serum.
 J. Clin. Physiol. 155, 302 (1961)
41. G. Ruhenstroth-Bauer und W. Piper
 Zur Methodik der Zellkataphorese.
 Klin. Wschr. 34, 9 (1956)
42. G. Ruhenstroth-Bauer und P. Sachtleben
 Die Zellelektrophorese.
 Medizinische Grundlagenforschung II (Stuttgart 1959)
43. B. Sachsse
 Insulin-Antikörper und Inhibitoren.
 Dtsch. med. Wschr. 84, 90 (1958)

44. P. Sachtleben, G.F. Fuhrmann, E. Straub und
G. Ruhenstroth-Bauer
Fortschritte in der Methodik der Zellelektrophorese.
Klin. Wschr. 39, 839 (1961)
45. P. Sachtleben und G. Ruhenstroth-Bauer
Die Änderung der elektrischen Oberflächenladung von
Erythrocyten durch agglutinierende und sensibilisierende
Substanzen.
Med. exp. 6, 183 (1962)
46. P. Sachtleben und E. Straub
Der Einfluß von Antiseren auf das elektrokinetische
Potential virusbesetzter Erythrocyten.
Ztschr. ges. exp. Med. 132, 11 (1959)
47. F. Scheiffarth und W. Frenger
Die Verwendbarkeit der passiven oder indirekten
Hämagglutinationsreaktion nach Boyden beim Nachweis
von Antikörpern.
Blut 2, 102 (1956)
48. F. Scheiffarth, W. Frenger und G. Möckel
Serologische Studien über das Wesen der Insulin-Antikörper,
Dtsch. med. Wschr. 84, 177 (1959)
49. G.V. Seaman
Electrophoresis using a Cylindrical Chamber.
Cell electrophoresis (London 1965)
50. G.V. Seaman and D.H. Heard
A microelectrophoresis chamber of small volume for
use with biological systems.
Blood 18, 599 (1961)
51. J.C. Shipp, R.O. Russell, J. Steinke, M.L. Mitchell
and W.B. Hadley
Insulin-Resistance with High Levels of Circulating Insulin -
Like Activity Demonstrable in Vivo and in Vitro.
Diabetes 10, 1 (1961)

52. J.H. Skom and D.W. Talmage
Non-Precipitating Insulin-Antibodies.
J. Clin. Invest. 37, 783 (1958)
53. A.B. Stavitsky und E.R. Arquilla
Insulin-Antikörper und ihre klinische Bedeutung.
Klin. Wschr. 36, 341 (1958)
54. H. Steigerwald und W. Spielmann
Nachweis von Insulinantikörpern bei Diabetikern mit
Insulinresistenz im Hämagglutinationstest und Coombstest.
Klin. Wschr. 34, 80 (1956)
55. G. Szécsey, M. Bretan, G. Bikich und L. Kammerer
Der Nachweis von Insulin-Antikörpern bei Zuckerkranken
durch passives Hämagglutinationsverfahren.
Zeitschrift für Immunitäts- und Allergieforschung 120,
253 (1963)
56. J. Schlichtkrull, J. Brange, Aa. Hein Christiansen, O.
Hallund, L.G. Heding, K.H. Jorgensen
Clinical Aspects of Insulin-Antigenicity.
Diabetes 21. 649, (1972)
57. P.H. Wright
The Effect of Insulin Antibodies on Glucose Uptake
by Isolated Rat Diaphragma.
Biochem. J. 71, 633 (1959)

Abbildung 1

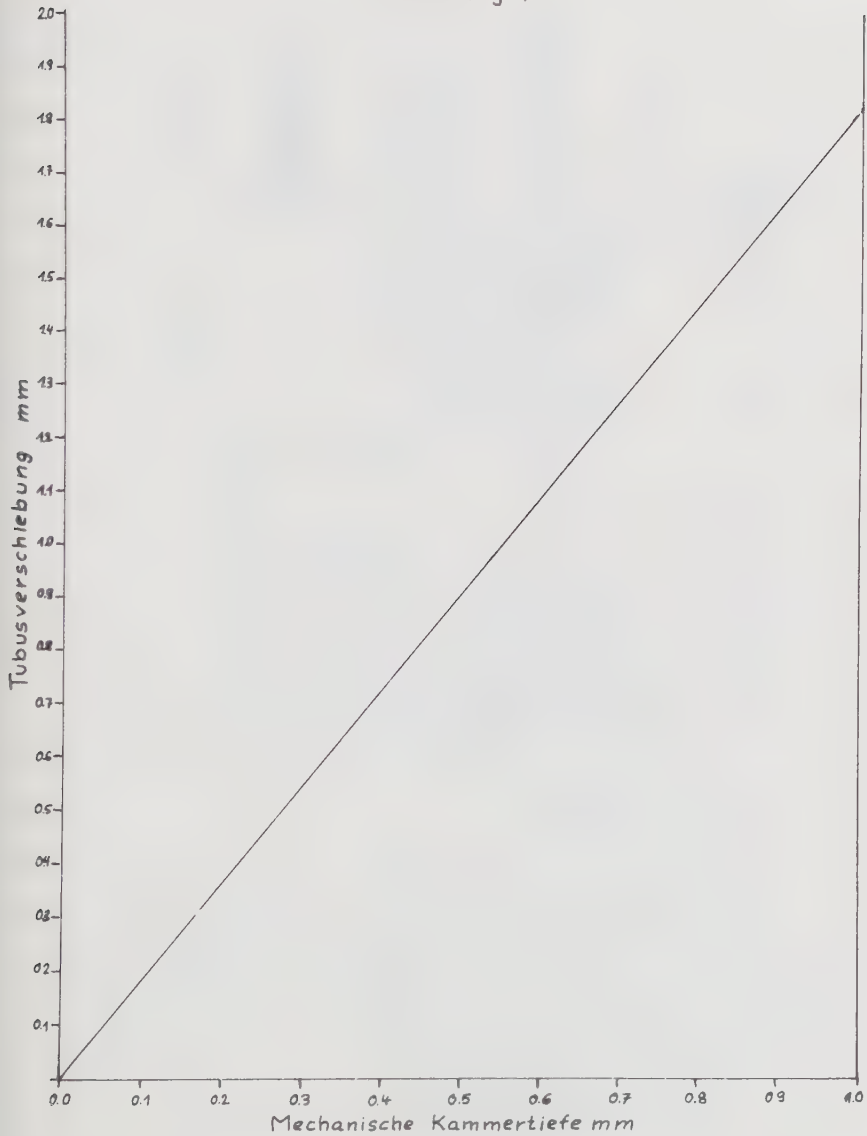


Abbildung 2

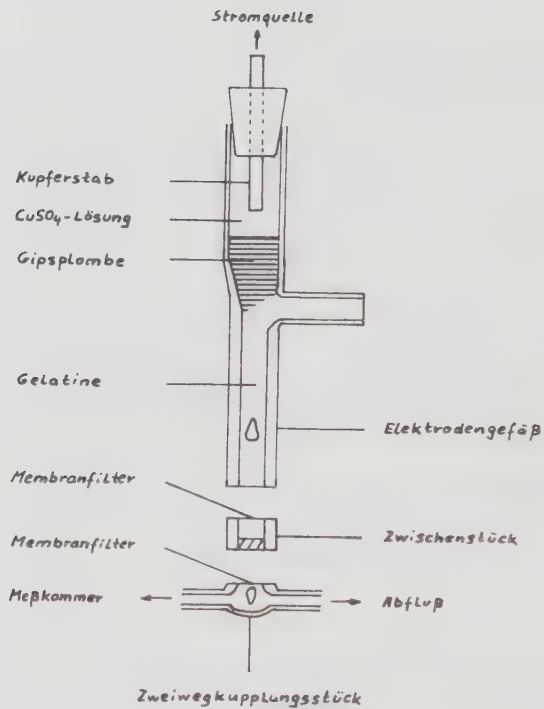
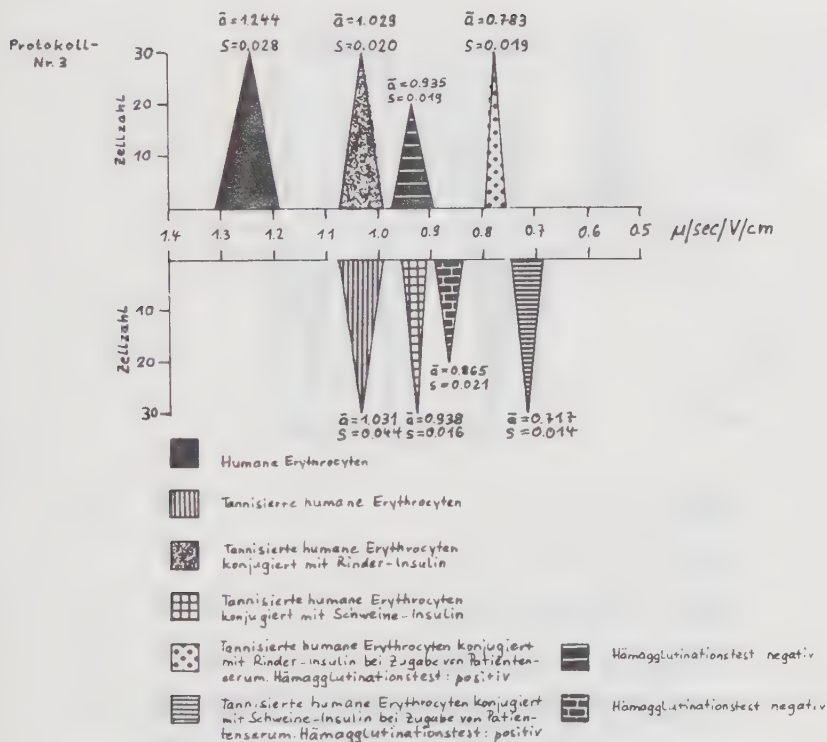


Abbildung 3



Schematisierte Meßkammer :
Doppelkreislauf und gestrichelt
angedeutete „stationäre Ebenen“

Abbildung 4

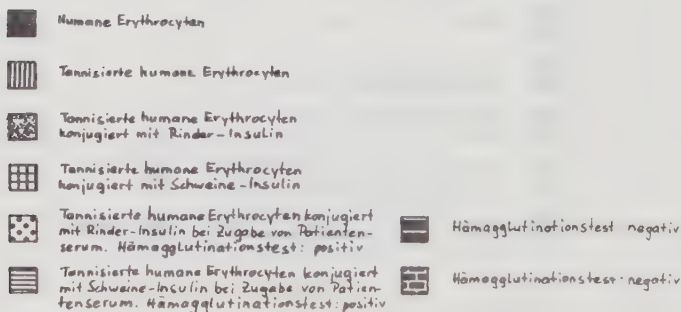
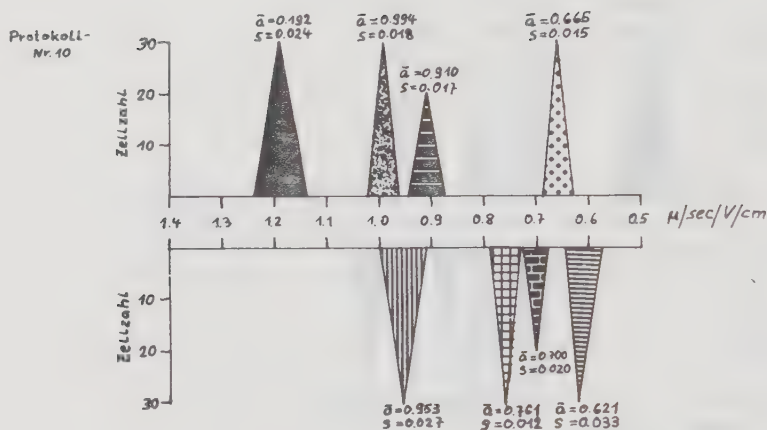


Hämagglutinationstabelle

	Verdünnung (Patientenserum)							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Tannierte Erythrocyten	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Tannierte Erythrocyten mit Rinder-Insulin	+++	+++	++	∅	∅	∅	++	++
Tannierte Erythrocyten mit Schweine-Insulin	∅	∅	∅	∅	∅	++	++	+

Kontrollen: negativ

Abbildung 5



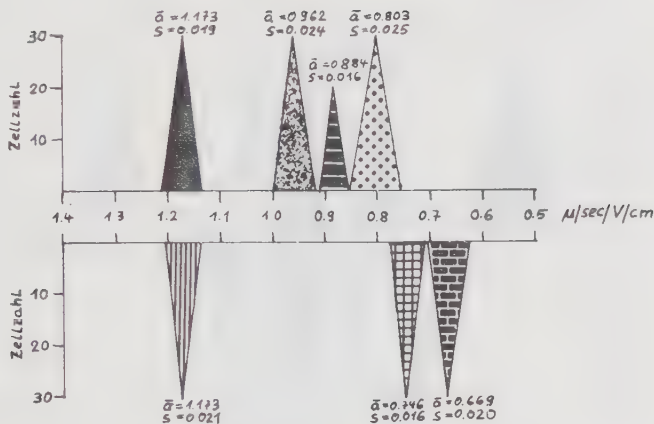
Hämagglutinationstabelle

	Verdünnung (Patientenserum)							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Tensierte Erythrocyten	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Tensierte Erythrocyten mit Rinder-Insulin	+++	+++	++	∅	∅	∅	++	+
Tensierte Erythrocyten mit Schweine-Insulin	+	++	∅	∅	∅	∅	+	∅

Kontrollen : negativ

Abbildung 6

Protokoll-
Nr. 12



Humane Erythrocyten



Tennisierte humane Erythrocyten



Tennisierte humane Erythrocyten
konjugiert mit Rinder-Insulin



Tennisierte humane Erythrocyten
konjugiert mit Schweine-Insulin



Tennisierte humane Erythrocyten konjugiert
mit Rinder-Insulin bei Zugabe von Patienten-
serum. Hämagglutinationstest: positiv



Tennisierte humane Erythrocyten konjugiert
mit Schweine-Insulin bei Zugabe von Patien-
tenserum. Hämagglutinationstest: negativ



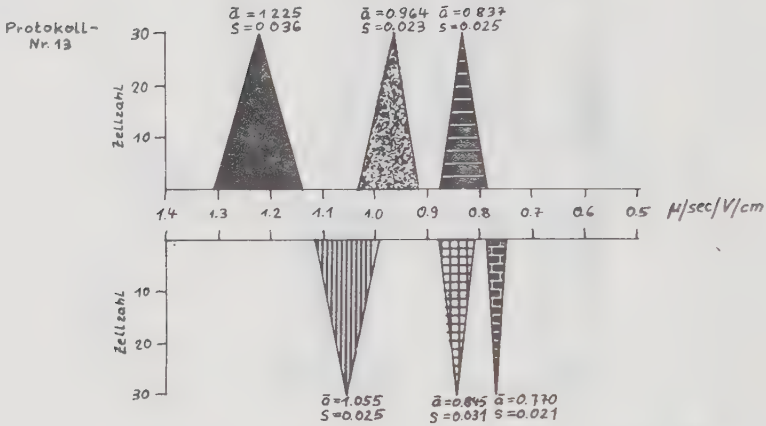
Hämagglutinationstest: negativ

Hämagglutinationstabelle

	Verdünnung (Patientenserum)							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Tennisierte Erythrocyten	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Tennisierte Erythrocyten mit Rinder-Insulin	+	+	+	∅	∅	∅	+	+
Tennisierte Erythrocyten mit Schweine-Insulin	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Kontrollen: negativ

Abbildung 7



- Humane Erythrocyten
- Tannierte humane Erythrocyten
- Tannierte humane Erythrocyten konjugiert mit Rinder-Insulin
- Tannierte humane Erythrocyten konjugiert mit Schweine-Insulin
- Tannierte humane Erythrocyten konjugiert mit Rinder-Insulin bei Zugabe von Patientenserum. Hämagglutinationstest: negativ
- Tannierte humane Erythrocyten konjugiert mit Schweine-Insulin bei Zugabe von Patientenserum. Hämagglutinationstest: negativ

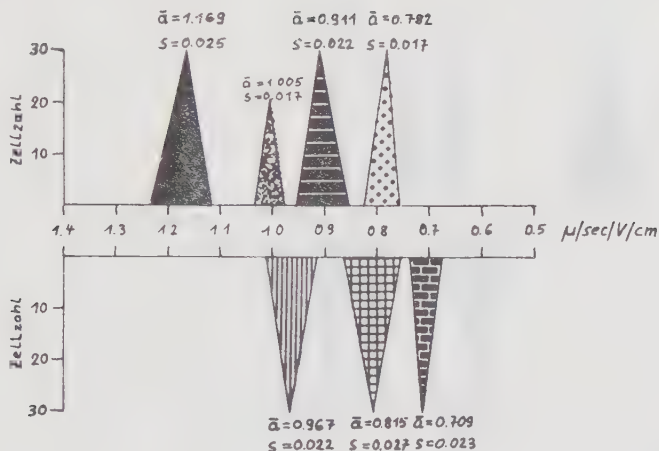
Hämagglutinationstabelle

	Verdünnung (Patienten Serum)							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Tannierte Erythrocyten	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Tannierte Erythrocyten mit Rinder-Insulin	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Tannierte Erythrocyten mit Schweine-Insulin	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Kontrollen : negativ

Abbildung 8

Protokoll-
Nr. 16



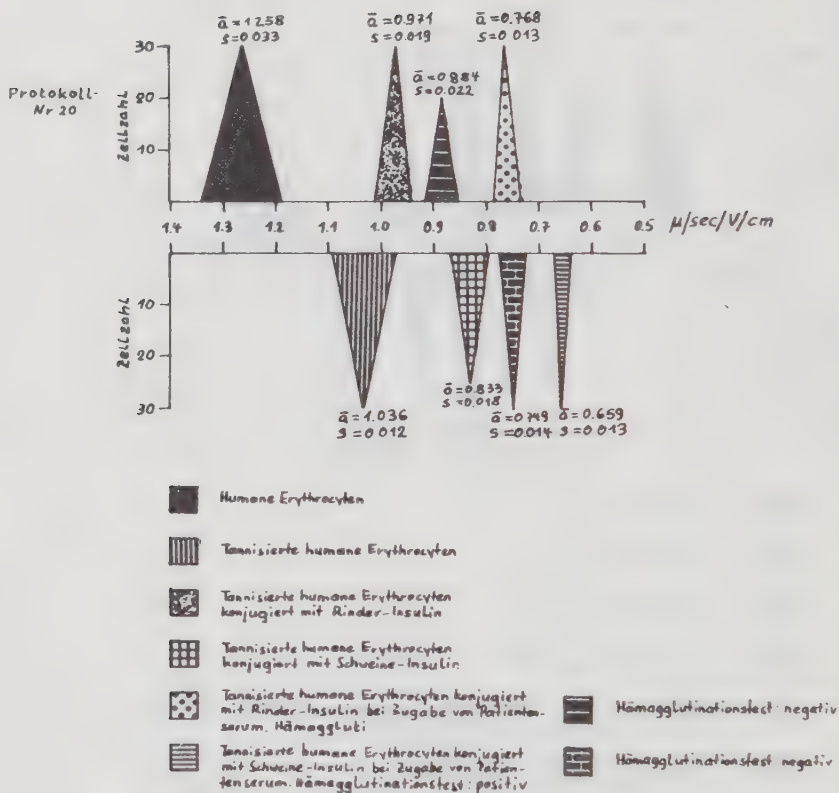
- Humane Erythrocyten
- Tannierte humane Erythrocyten
- Tannierte humane Erythrocyten konjugiert mit Rinder-Insulin
- Tannierte humane Erythrocyten konjugiert mit Schweine-Insulin
- Tannierte humane Erythrocyten konjugiert mit Rinder-Insulin bei Zugabe von Patienten-serum. Hämagglutinationstest: positiv
- Hämagglutinationstest negativ
- Tannierte humane Erythrocyten konjugiert mit Schweine-Insulin bei Zugabe von Patienten-serum. Hämagglutinationstest: negativ

Hämagglutinationstabelle

	Verdünnung (Patientenserum)							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Tannierte Erythrocyten	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Tannierte Erythrocyten mit Rinder-Insulin	∅	++	++	∅	∅	∅	∅	∅
Tannierte Erythrocyten mit Schweine-Insulin	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Kontrollen: negativ

Abbildung 9



Hämagglutinationstabelle

	Verdünnung (Patientenserum)							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Tannierte Erythrocyten	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Tannierte Erythrocyten mit Rinder-Insulin	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+++	+++	+++
Tannierte Erythrocyten mit Schweine-Insulin	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Kontrollen: negativ

Herrn Professor Dr.med. H.Michel
gilt mein herzlicher Dank für
die Überlassung des Themas, und
für seine freundliche Unterstützung
und Ratschläge zur Anfertigung
dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

22.8.1942 in Berlin geboren.

1949-1961 Besuch der Oberschule in Hennigsdorf und Berlin.

1961 Reifeprüfung in Berlin.

1961-1969 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität
Berlin

1969 Oktober ärztliche Prüfung bestanden.

1969 November-Dezember 1970 als Medizinalassistent
in Berlin und Hiltrup/Westfalen tätig.

Seit Februar 1971 wissenschaftlicher Assistent an der
Medizinischen Universitätsklinik Münster.

